

(19) 【発行国】 日本国特許庁 (J P)	(19) [Publication Office] Japanese Patent Office (JP)
(12) 【公報種別】 公開特許公報 (A)	(12) [Kind of Document] Japan Unexamined Patent Publication (A)
(11) 【公開番号】 特開平 5 - 3 2 8 9 8 1	(11) [Publication Number of Unexamined Application (A)] Japan Unexamined Patent Publication Hei 5 - 328981
(43) 【公開日】 平成 5 年 (1 9 9 3) 1 2 月 1 4 日	(43) [Publication Date of Unexamined Application] 19 93 (1993) December 14 day
(54) 【発明の名称】 パラヒドロキシ安息香酸の製造方法	(54) [Title of Invention] MANUFACTURING METHOD OF P-HYDROXYBENZOIC ACID
(51) 【国際特許分類第 5 版】	(51) [International Patent Classification 5th Edition]
C12P 7/40 8114-4B	C12P 7/40 811 4- 4B
// (C12P 7/40	// (C12P 7/40
C12R 1:01)	C12R 1: 01)
【審査請求】 未請求	[Request for Examination] Examination not requested
【請求項の数】 5	[Number of Claims] 5
【全頁数】 5	[Number of Pages in Document] 5
(21) 【出願番号】 特願平 4 - 1 4 4 3 3 5	(21) [Application Number] Japan Patent Application Hei 4 - 144335
(22) 【出願日】 平成 4 年 (1 9 9 2) 6 月 4 日	(22) [Application Date] 1992 (1992) June 4 day
(71) 【出願人】	(71) [Applicant]
【識別番号】 0 0 0 0 0 1 2 5 8	[Applicant Code] 000001258
【氏名又は名称】 川崎製鉄株式会社	[Name] KAWASAKI STEEL CORPORATION (DB 69-053-8244)
【住所又は居所】 兵庫県神戸市中央区北本町通 1 丁目 1 番 2 8 号	[Address] Hyogo Prefecture Kobe City Chuo-ku Kita Honmachi-dori 1-1-28
(72) 【発明者】	(72) [Inventor]
【氏名】 武 内 大 造	[Name] Takeuchi, Daizo
【住所又は居所】 千葉県千葉市中央区川崎町 1 番地 川崎製鉄株式会社技術研究本部内	[Address] Inside of Chiba Prefecture Chiba City Chuo-ku Kawasaki-cho 1 Kawasaki Steel Corporation (DB 69-053-8244) technology research headquarters
(72) 【発明者】	(72) [Inventor]
【氏名】 上 原 健 一	[Name] Uehara, Kenichi
【住所又は居所】 千葉県千葉市中央区川崎町 1 番地 川崎製鉄株式会社技術研究本部内	[Address] Inside of Chiba Prefecture Chiba City Chuo-ku Kawasaki-cho 1 Kawasaki Steel Corporation (DB 69-053-8244) technology research headquarters

(72) 【発明者】

【氏名】 石 倉 正 治

【住所又は居所】 千葉県千葉市中央区川崎町 1 番地 川崎製鉄株式会社技術研究本部内

(74) 【代理人】

【弁理士】

(57) 【要約】

【目的】 従来は高温・高圧の反応で化学合成されていたパラヒドロキシ安息香酸を省エネルギー的に微生物による変換によりパラクレゾールから安価に製造する方法。

【構成】 エンテロバクター属に属し、パラクレゾールをパラヒドロキシ安息香酸に変換する能力を持った菌体を用いて、パラクレゾールをパラヒドロキシ安息香酸に変換するパラヒドロキシ安息香酸の製造方法。例えば、前記菌体を増殖させた後、パラクレゾールを添加して培養を継続するか、または増殖の開始点でパラクレゾールを添加して培養し、パラクレゾールをパラヒドロキシ安息香酸に変換させた後、その培養液からパラヒドロキシ安息香酸を分離するパラヒドロキシ安息香酸の製造方法。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 エンテロバクター属に属する菌体を用いて、パラクレゾールをパラヒドロキシ安息香酸に変換することを特徴とするパラヒドロキシ安息香酸の製造方法。

【請求項 2】 前記エンテロバクター属に属する菌体を、パラクレゾールを添加した培地で培養する請求項 1 に記載のパラヒドロキシ安息香酸の製造方法。

【請求項 3】 前記エンテロバクター属に属する菌体を培養して菌体を増殖させた後、パラクレゾールを一度にあるいは分割して添加して培養を継続する請求項 1 に記載のパラヒドロキシ安息香酸の製造方法。

【請求項 4】 前記エンテロバクター属に属する菌体を培養させた後、菌体を回収して、該菌体を用いてパラクレゾールをパラヒドロキシ安息香酸に変換する請求項 1 または 2 に記載のパラヒドロキシ安息香酸の製造方法。

(72) [Inventor]

[Name] Ishikura Masaharu

[Address] Inside of Chiba Prefecture Chiba City Chuoku Kawasaki-cho 1 Kawasaki Steel Corporation (DB 69-053-8244) technology research headquarters

(74) [Attorney(s) Representing All Applicants]

[Patent Attorney]

(57) [Abstract]

[Objective] P-hydroxybenzoic acid which chemical synthesis is done until recently with reaction of the high temperature * high pressure method which from para cresol is produced in inexpensive with the conversion with microorganism in energy conserving.

[Constitution] Manufacturing method of p-hydroxybenzoic acid which converts para cresol to p-hydroxybenzoic acid making use of cell mass which had capacity which belongs to Enterobacter, converts para cresol to p-hydroxybenzoic acid. manufacturing method of p-hydroxybenzoic acid which after multiplying, adding para cresol, continuing culture, or adding para cresol with starting point of multiplication cultures for example aforementioned cell mass, para cresol in the p-hydroxybenzoic acid after converting, separates p-hydroxybenzoic acid from fermentation broth.

[Claim(s)]

[Claim 1] Manufacturing method of p-hydroxybenzoic acid which designates that para cresol is converted to the p-hydroxybenzoic acid making use of cell mass which belongs to Enterobacter, as a feature.

[Claim 2] Cell mass which belongs to aforementioned Enterobacter, manufacturing method of the p-hydroxybenzoic acid which is stated in Claim 1 which is cultured with culture medium which adds para cresol.

[Claim 3] Culturing cell mass which belongs to aforementioned Enterobacter, the cell mass after multiplying, or dividing para cresol at one time, adding the manufacturing method of p-hydroxybenzoic acid which it states in Claim 1 which continues culture.

[Claim 4] Cell mass which belongs to aforementioned Enterobacter after culturing, the cell mass recovering manufacturing method of p-hydroxybenzoic acid which it states in the Claim 1 or 2 which converts para cresol to p-hydroxybenzoic acid making use of said cell mass.

【請求項5】前記エンテロバクター属に属する菌体が、エンテロバクター・クロッカエ (*Enterobacter cloacae*) である請求項1～4のいずれかに記載のパラヒドロキシ安息香酸の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、パラクレゾールを微生物を用いて変換し、パラヒドロキシ安息香酸を製造する方法に関する。さらに詳しく述べると、本発明は、エンテロバクター属に属し、パラクレゾールをパラヒドロキシ安息香酸に変換する能力を持った菌体を用いて、パラクレゾールをパラヒドロキシ安息香酸に変換するパラヒドロキシ安息香酸の製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】従来、パラヒドロキシ安息香酸の製造は、フェノールを原料とし、そのカリウム塩に二酸化炭素を高温・高压下で作用させるKolbe・シュミット法による化学合成法が一般に行われてきた。しかし、反応条件として高温・高压を要するためにエネルギー消費量が大きく、またアルカリ塩を多量に使用するなどの問題があった。

【0003】一方、微生物を用いたパラヒドロキシ安息香酸の製造法は、常温・常圧で進行し、エネルギー的にも有利なことが期待される。しかし、これまでの微生物転換法はアスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger* (UBC814)) の菌体抽出酵素による安息香酸からのパラヒドロキシ安息香酸の生成 (Reddy, C. C. & Vaidyanathan, C. S.; *Biochim. Biophys. Acta* 384, 46-57) や、パラキシレンを唯一の炭素源とするシュードモナス・エルギノーザ (*Pseudomonas aeruginosa*) のパラキシレン代謝経路でパラクレゾールやパラヒドロキシ安息香酸を抽出している例 (大森など, *Agri. Biol. Chem.* Vol 31, 1337 (1967))、シュードモナス属菌株のパラクレゾール代謝 (S. Dagrey および M. D. Patel; *Biochem. J.*, 66, 227 (1967)) が知られている程度で、しかもいずれの反応も安息香酸からの生成や代謝分解中間体としてパラヒドロキシ安息香酸を抽出して、パラキシレンの分解がパラヒドロキシ安息香酸を経て進行することを明らかにしているに過ぎない。パラクレゾールを微生物に原料として与え、これを変換してパラヒドロキシ安息香酸を生成させて培地中に蓄積させて採取することは示唆されていない。

[Claim 5] Cell mass which belongs to aforementioned *Enterobacter*, manufacturing method of the p-hydroxybenzoic acid which is stated in any of Claims 1 through 4 which is a *Enterobacter cloacae* (*Enterobacter cloacae*).

[Description of the Invention]

[0001]

[Field of Industrial Application] This invention converts para cresol making use of microorganism, regards the method which produces p-hydroxybenzoic acid. Furthermore when you express in detail, this invention belongs to the *Enterobacter*, regards manufacturing method of p-hydroxybenzoic acid which converts para cresol to the p-hydroxybenzoic acid making use of cell mass which had capacity which converts the para cresol to p-hydroxybenzoic acid.

[0002]

[Prior Art] Until recently, production of p-hydroxybenzoic acid designated phenol as the starting material, in potassium salt chemically synthetic method due to Kolbe-Schmitt method which operates under the high temperature * high pressure was done carbon dioxide generally. But, there was a or other problem to which energy consumption is large in order to require the high temperature * high pressure, as reaction condition in addition uses alkali salt for large amount.

[0003] On one hand, it advances production method of p-hydroxybenzoic acid which uses microorganism, with ambient temperature * ambient pressure, beneficial thing is expected also energetically. But, As for former microorganism conversion method formation (Reddy, C.C. & Vaidyanathan, C.S.; *Biochimica et Biophysica Acta* (0005-2728, BBBMBS) 384, 46-57) of p-hydroxybenzoic acid from the benzoic acid due to microbe mass extraction enzyme of *Aspergillus niger* (*Aspergillus niger* (UBC814)) and, Detects para cresol and p-hydroxybenzoic acid with paraxylene metabolism route of *Pseudomonas aeruginosa* (*Pseudomonas aeruginosa*) which designates paraxylene as carbon source of only one example (Agri. Biol. Chem. Vol 31, 1337 (1967) such as Omori) which, With extent where para cresol metabolism (S. Dagrey and M.D. Patel; *Biochemical Journal* (0264-6021, BIJOAK), 66, 227 (1967)) of *Pseudomonas* sp. strain is known, detecting the p-hydroxybenzoic acid furthermore each reaction as formation and metabolism disassembly intermediate from benzoic acid, disassembly of paraxylene passing by p-hydroxybenzoic acid, it only makes fact that it advances clear. Giving para cresol to microorganism converting this and forming p-hydroxybenzoic acid as the starting material, work quantity accumulating in

【0004】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、常温・常圧で進行する経済的な微生物転換法を利用して、パラヒドロキシ安息香酸を製造する新規な方法を提供することである。

【0005】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、化学的合成法よりも省エネルギー的である微生物の物質変換能に着目した。すなわち、微生物に増殖を支える基質を与えて増殖させ、この培養液にパラクレゾールを共存させて、これを酸化し、変換させるコ・オキシデーション (Co-oxidation) の方法によってパラヒドロキシ安息香酸を生成させ、これを分解させることなく著量蓄積させる方法を完成することを目的とした。そこで、本発明者らはコ・オキシデーションによりパラクレゾールからパラヒドロキシ安息香酸を生成する能力を持つ微生物を検索した結果、エンテロバクター属に属する細菌菌株に、パラクレゾールのみをパラヒドロキシ安息香酸に変換する菌株を見だし、本発明を完成した。

【0006】すなわち、本発明は、エンテロバクター属に属し、パラクレゾールをパラヒドロキシ安息香酸に変換する能力を持った菌体を用いて、パラクレゾールをパラヒドロキシ安息香酸に変換するパラヒドロキシ安息香酸の製造方法を提供する。前記エンテロバクター属に属し、パラクレゾールをパラヒドロキシ安息香酸に変換する能力を持った菌体をパラクレゾールを添加した培地で培養するパラヒドロキシ安息香酸の製造方法を提供する。前記エンテロバクター属に属し、パラクレゾールをパラヒドロキシ安息香酸に変換する能力を持った菌体を培養して菌体を増殖させた後、パラクレゾールを一度にあるいは分割して添加して培養を継続するパラヒドロキシ安息香酸の製造方法を提供する。前記エンテロバクター属に属する菌体を培養させた後、菌体を回収して、該菌体を用いてパラクレゾールをパラヒドロキシ安息香酸に変換するパラヒドロキシ安息香酸の製造方法を提供する。前記エンテロバクター属に属し、パラクレゾールをパラヒドロキシ安息香酸に変換する能力を持った菌体が、エンテロバクター・クロッカエ (Enterobacter cloacae) であるパラヒドロキシ安息香酸の製造方法を提供する。

【0007】本発明で使用する菌株は、エンテロバクター属に

culture medium, it is not suggested that it recovers.

[0004]

[Problems to be Solved by the Invention] Objective of this invention making use of economic microorganism conversion method which is advanced with the ambient temperature * ambient pressure, is to offer novel method which produces p-hydroxybenzoic acid.

[0005]

[Means to Solve the Problems] As for these inventors, you paid attention to substance conversion ability of microorganism which is a energy conserving in comparison with chemical synthesis method. Giving substrate which supports multiplication in namely, microorganism multiplying, it designated that you complete method which coexisting, oxidation it did this, forming p-hydroxybenzoic acid with method of the co-oxidation (Co-oxidation) which is converted, work quantity accumulates para cresol to this fermentation broth without disassembling this as object. Then, as for these inventors as for result of searching microorganism which has capacity which forms p-hydroxybenzoic acid from para cresol with co-oxidation, in the bacteria strain which belongs to Enterobacter, strain which converts only the para cresol to p-hydroxybenzoic acid was discovered, this invention was completed.

[0006] Namely, this invention belongs to Enterobacter, offers manufacturing method of p-hydroxybenzoic acid which converts para cresol to p-hydroxybenzoic acid making use of cell mass which had the capacity which converts para cresol to p-hydroxybenzoic acid. It belongs to aforementioned Enterobacter, cell mass which had capacity which converts para cresol to p-hydroxybenzoic acid it offers manufacturing method of p-hydroxybenzoic acid which is cultured with culture medium which adds para cresol. It belongs to aforementioned Enterobacter, culturing cell mass which had the capacity which converts para cresol to p-hydroxybenzoic acid cell mass after multiplying, or dividing para cresol at one time, adding, it offers the manufacturing method of p-hydroxybenzoic acid which continues culture. cell mass which belongs to aforementioned Enterobacter after culturing the cell mass recovering, it offers manufacturing method of p-hydroxybenzoic acid which converts the para cresol to p-hydroxybenzoic acid making use of said cell mass. It belongs to aforementioned Enterobacter, cell mass which had capacity which converts para cresol to p-hydroxybenzoic acid, offers manufacturing method of p-hydroxybenzoic acid which is a Enterobacter cloacae (Enterobacter cloacae).

[0007] Strain which is used with this invention if amo

属するものの内、パラクレゾールを選択的にパラヒドロキシ安息香酸に変換する能力を有する菌株であればよい。したがって、土壌から単離した菌株で、バーヂス・マニュアル・オブ・システムチック・バクテリオロジー (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology), Vol. 1 (1984) に記載の基準により、エンテロバクター属に属する菌株であると特定した菌株であってもよい。本発明の具体的なエンテロバクター属に属する菌体としては、エンテロバクター・クロッカエ (Enterobacter cloacae) IFO 13535 が挙げられる。

【0008】本発明者は、この細菌菌株が、上述したように、コ・オキシレーション作用によりパラクレゾールを変換して、パラヒドロキシ安息香酸を生成することができることを知見し本発明に至った。

【0009】本発明の製造方法は、エンテロバクター属に属する菌体のコ・オキシレーション作用を利用することにより、微生物の培養液中に出発物質を共存させ、微生物の増殖は変換させたい出発物質とは別の、増殖に必要な炭素源、窒素源で行い、増殖した微生物が培養液中に共存させた出発原料を酸化・変換させること、あるいは増殖した微生物を分離回収した後、微生物菌体を懸濁した反応液を調整して変換反応に必要なエネルギー源を供給しながら微生物の酸化能力を利用して出発原料を酸化・変換させることであり、本発明では、エンテロバクター属に属する細菌、例えばエンテロバクター・クロッカエに属する菌株、特にエンテロバクター・クロッカエ IFO 13535 株を用いて、パラクレゾールをパラヒドロキシ安息香酸に酸化・変換することである。

【0010】本発明の製造方法は、微生物を増殖させる工程および微生物を利用してパラクレゾールをパラヒドロキシ安息香酸に変換する工程を包含する。また、微生物を増殖させる工程（増殖工程）と微生物を利用してパラクレゾールをパラヒドロキシ安息香酸に変換する工程（変換工程）は、別々の工程であっても、同時に行われる工程であってもよい。

【0011】本発明の方法で使用する細菌菌株を増殖する（増殖工程）ための培地としては、通常の細菌用培地を使用してもよいが、この菌株が良好に成育できる培地で、かつ微生物変換反応を進行させるものであれば、いかなる組成の培地も使用できる。この時に用いる培地は、培地成分として、適当な炭素源、窒素源および無機塩などを含有する。また、本発明の変換工程に使用する培地は、菌体増殖用と同様の培地を用いてもよく、また異なる培地を用いてもよい。また、菌体を増殖させた後、菌体の変換作用を維持できる溶液、例えば、生理食塩水の

ng those which belong to the Enterobacter, a strain which possesses capacity which converts para cresol to selectively p-hydroxybenzoic acid it should have been. Therefore, with strain which is isolated from soil, when it is a strain which belongs to Enterobacter with reference which is stated in the Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology), Vol. 1 (1984), it is possible to be a strain which identification is done. You can list Enterobacter cloacae (Enterobacter cloacae) IFO 13535 as cell mass which belongs to exemplary Enterobacter of the this invention.

[0008] This bacteria strain, above-mentioned way, converting para cresol with co-oxidation action, being able to form p-hydroxybenzoic acid knowledge it did this invention and, reached to this invention.

[0009] As for manufacturing method of this invention, In utilizing co-oxidation action of cell mass which belongs to Enterobacter to depend, starting substance coexisting to culture medium of microorganism, As for multiplication of microorganism you want to convert difference from the starting substance which, Necessity for multiplication is carbon source, With nitrogen source to do, starting material where microorganism which multiplied coexists to culture medium the oxidation * is converted thing. Or microorganism which multiplied separation and recovery was done rear, Adjusting reaction mixture which microbial cell mass suspension is done, while supplying energy source which is necessary for conversion reaction it is oxidation * to convert starting material making use of oxidation ability power of microorganism, with the this invention, para cresol it is oxidation * to convert in p-hydroxybenzoic acid making use of bacteria, belong to for example Enterobacter cloacae strain and especially Enterobacter cloacae IFO 13535 strain which belong to Enterobacter.

[0010] Manufacturing method of this invention includes step which converts para cresol to the p-hydroxybenzoic acid microorganism making use of step and microorganism which multiply. In addition, microorganism step (exchange step) which converts para cresol to p-hydroxybenzoic acid making use of step (amplification step) and microorganism which multiply also being a separate step it may be a step which is done simultaneously.

[0011] It is possible to use culture medium for conventional bacteria, bacteria strain which is used with method of this invention as culture medium because of (amplification step) it multiplies, but this strain if with culture medium which growth it is possible in good, it is something which at same time advances microbiotic conversion reaction, you can use culture medium of every composition. culture medium which is used this time, can contain suitable carbon source, nitrogen

ような溶液を培地の代わりに用いてもよい。培地成分に、前記菌体を増殖するための培地に含まれる成分と同じ成分を含み得る。

【0012】炭素源としては、本発明の菌株が利用できる任意の炭素源が使用できる。かかる炭素源として利用できる有機物には、上記の菌学的性質において示したように、グリセリンなどの有機化合物、グルコース、フラクトースなどの炭水化物、オリーブ油、大豆油などの脂質、エタノールなどのアルコールあるいはコーンステーパーリカー、廃糖蜜など農産物の抽出・精製残渣、あるいはマロン酸、クエン酸などの有機酸が例示できる。菌体増殖工程の培地の場合には、上述したような本発明の菌株が利用し得る1種または2種以上の炭素化合物を任意に炭素源として利用できる。また、変換工程の培地の場合には、菌体増殖工程と同じ炭素源が利用できるが、グリセリンなどの有機化合物、グルコース、フラクトースなどの炭水化物が好ましい。炭素源の含有量は、炭素源の種類によっても異なるが、培地中2重量%以上であるのが好ましい。

【0013】窒素源としては、特に限定されないが、硫酸アンモニウム、硝酸アンモニウムなどの無機窒素化合物、およびペプトン、酵母エキス、カザミノ酸などの有機窒素源が利用できる。有機窒素化合物を用いた場合、これには炭素も含まれているので、別の炭素源を新たに加えることは増殖用培地の場合には必ずしも必要としない。

【0014】無機塩類としては、各種のリン酸塩、硫酸マグネシウム、ナトリウム塩、カリウム塩等が使用できる。さらに、微量の重金属類（例えば、鉄塩、マンガン塩、銅塩、カルシウム塩、亜鉛塩、コバルト塩など）を培地に含有させてもよい。

【0015】培養方法としては、振盪培養法、深部通気攪拌培養法などの方法により行うことができる。培養温度は、20～37℃、pHは中性付近、攪拌は80～400rpm、培養日数は反応の進行に応じて決めることができるが、通常は菌体増殖に1～2日、バラクレゾールをパラヒドロキシ安息香酸に変

source and inorganic salt etc as culture medium component. In addition, culture medium which is used for exchange step of this invention making use of culture medium which is similar to one for cell mass proliferation is good, making use of culture medium which in addition differs is good. In addition, cell mass after multiplying, it is possible to use the solution like solution and for example physiological saline which can maintain conversion of cell mass in place of culture medium. Aforementioned cell mass it can include same component as component which is included in culture medium in order to multiply in culture medium component.

[0012] As carbon source, you can use optional carbon source which can utilize the strain of this invention. As shown in above-mentioned microbiological characteristic, extraction * purified residue of agricultural products such as glycerin or other organic compound, glucose, fructose or other carbohydrate, olive oil, soybean oil or other lipid, ethanol or other alcohol or corn steep liquor and blackstrap molasses, or it can illustrate to organic substance which it can utilize as this carbon source, malonic acid and citric acid or other organic acid. In case of culture medium of cell mass proliferation step, optionally it can utilize carbon compound of one, two or more kinds which strain of this invention can utilize as carbon source. In addition, in case of culture medium of exchange step, it can utilize the same carbon source as cell mass proliferation step, but, glycerin or other organic compound, glucose and fructose or other carbohydrate are desirable. Content of carbon source differs, with types of carbon source, but it is desirable to be a 2 wt% or more in culture medium.

[0013] As nitrogen source, especially it is not limited, but it can utilize the ammonium sulfate, ammonium nitrate or other inorganic nitrogen compound, and peptone, yeast extract and casamino acid or other organic nitrogen source. When organic nitrogen compound is used, because also carbon is included in this, that another carbon source is added anew, always does not need in case of the growth medium.

[0014] As inorganic salts, various phosphate, you can use magnesium sulfate, the sodium salt and potassium salt etc. Furthermore, it is possible to culture medium to contain heavy metal (Such as for example iron salt, manganese salt, copper salt, calcium salt, zinc salt and cobalt salt) of the trace amount.

[0015] As culture method, it is possible to do with shaker culture and deep part aerated stirred culture or other method. As for culture temperature, as for 20 to 37℃ and pH as for neutral vicinity and churning as for 80 to 400 rpm and culture days it is possible

換するのには、約2日が適当である。2日を超えると、菌体の増殖工程では、増殖能の低下の点で好ましくなく、変換工程では、副生成物が生成する点で好ましくない。両方の工程を合せて、2～3日程度であるのが適当である。この時に変換の原料となるパラクレゾールは水に難溶性であるために、ポリオキシエチレンソルビタンなどの各種の界面活性剤を培地に添加することも可能である。また、必要に応じて、脂肪酸エステル系、シリコン系などの消泡剤を添加してもよい。

【0016】本発明の製造方法に用いるパラクレゾールは、菌体の増殖培養開始時に添加してもよく、また、菌体の増殖培養後添加してもよい。さらに、増殖培養時および増殖培養後の両方に添加してもよい。菌体の増殖培養開始時に添加する場合、添加するパラクレゾールの培養液中の濃度は、3重量%以下、特に1重量%以下であるのが好ましく、さらに0.2～0.5重量%であるのが好ましい。3重量%超では、微生物が十分に作用しなくなるので好ましくない。また、菌体の増殖培養後添加する場合、パラクレゾールを添加する時期は、菌体濃度が、660nmの吸光度で、1.0～10.0の時に添加するのが好ましい。また、経時的に添加する場合、増殖後1日目、2日目に等量に分割して添加してもよいし、さらに低濃度で、例えば0.2～0.3重量%濃度を保ちながら、菌体の増殖にあわせて連続的に添加してもよい。添加するパラクレゾールの培養液中の濃度は、3重量%以下、特に1重量%以下であるのが好ましく、さらに0.2～0.5重量%であるのが好ましい。5重量%超では、微生物が十分に作用しなくなるので好ましくない。パラクレゾールを添加する時期を、菌体の増殖前にするのと増殖後にするのでは、菌体の増殖後に添加した方が5～10%変換率が高い。

【0017】さらに、増殖工程および変換工程を、パラクレゾールを添加する時期の組み合わせで考えると、以下の組み合わせが例示される。

1) パラクレゾールを、増殖工程の開始点で加え、増殖工程と変換工程を同時に行う。

to decide according to advance of reaction, but usually in order 1 to 2 day, to convert para cresol to p-hydroxybenzoic acid in cell mass proliferation, approximately 2 day is suitable. When it exceeds 2 day, with amplification step of cell mass, it is not desirable in point of decrease of proliferation, with exchange step, it is not desirable in point which by-product forms. step of both it is suitable together, to be a 2 to 3 days extent. para cresol which becomes starting material of conversion this time because it is a poorly soluble in water, adding polyoxyethylene sorbitan or other various surfactant to culture medium is possible. In addition, according to need and fatty acid ester system, it is possible to add the silicon type or other foam inhibitor.

[0016] It is possible to add para cresol which is used for manufacturing method of the invention, at time of multiplication start of culture of cell mass, in addition, multiplication culture post addition of cell mass to do it is possible. Furthermore, at time of multiplication culture and it is possible to add to both after multiplication culturing. When it adds at time of multiplication start of culture of cell mass, as for concentration of culture medium of para cresol which is added, it is desirable to be a 3 wt% or less and especially 1 wt% or less, furthermore it is desirable to be a 0.2 to 0.5 weight%. Because 3 wt% super with, microorganism stops operating fully, it is not desirable. In addition, when multiplication culture post addition of cell mass it does, as for time which adds para cresol, when cell concentration, with the absorbance of 660 nm, being a 1.0 to 10.0, it is desirable to add. In addition, when it adds to time wise, after multiplying dividing into equivalent in 1st day, and 2nd day it is possible to add while and, furthermore with low concentration, maintaining for example 0.2 to 0.3 wt% concentration, adjusting to the multiplication of cell mass, it is possible to add to continuous. As for concentration of culture medium of para cresol which it adds, it is desirable to be a 3 wt% or less and especially 1 wt% or less, furthermore it is desirable to be a 0.2 to 0.5 weight%. Because with 5 weight % over, microorganism stops operating fully, it is not desirable. That time which adds para cresol, is designated as before multiplying of cell mass it makes after multiplying that with, one which adds after multiplying of cell mass 5 to 10 % conversion ratio is high.

[0017] Furthermore, when of amplification step and exchange step, are thought with combination of time which adds para cresol, combination below the is illustrated.

1) para cresol, is added with starting point of amplification step, amplification step and exchange step are done simultaneously.

2) 微生物を増殖させた後パラクレゾールを加えて、変換工程を行う。パラクレゾールの添加は、変換工程の途中、または開始点と途中の両方で添加する。

3) パラクレゾールの添加を増殖工程と変換工程とに各々少なくとも1回以上行い、増殖工程の後に菌体を培地から分離して変換工程の培地に移植する。

上述の変換工程の培地は、増殖工程に用いた培地と同様の培地であってもよく、また、本発明の菌体が有する変換作用を妨げない溶液、例えば、生理食塩水のような溶液であってもよい。また、前記2)の方法では、菌体を増殖後、パラクレゾールを添加して培養を継続することが含まれる。

【0018】変換反応終了後、生成したパラヒドロキシ安息香酸を培養液から分離・精製する方法は、一般の有機化合物の分離・精製と同様に、溶媒抽出、カラムクロマトグラフィー、中和、濃縮、結晶化などの当業者に周知の手段を適宜組合せることにより行うことができる。たとえば、培養液から固体を遠心分離によって除いた後、上清を濃縮し、次いで酸性化してパラヒドロキシ安息香酸を沈殿させて固液分離する方法、あるいは上記上清を酸性化した後、酢酸エチル、クロロホルムなどの有機溶媒による溶媒抽出で生成物を分離する方法がある。また、パラヒドロキシ安息香酸が生成後沈殿している場合は、酢酸エチルなどの溶媒抽出による回収が有効な方法である。得られた粗製物を各種のカラムクロマトグラフィーあるいは再結晶などの方法によって精製することができる。

【0019】本発明の方法により製造されるパラヒドロキシ安息香酸は、防腐剤として使用される他、医薬品、農薬、染料、液晶などの原料として有用である。

【0020】

【実施例】以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。

【0021】（実施例1）本実施例は、本発明の方法によるパラクレゾールからパラヒドロキシ安息香酸への微生物による変換を例示する。使用した培地は下記組成のものであった。

2) microorganism after multiplying including para cresol, exchange steps done. Addition of para cresol, adds with both in middle, or starting point and middle of exchange step.

3) it adds para cresol in amplification step and exchange step each the one time or more, separates cell mass from culture medium at least after amplification step and the transplant does in culture medium of exchange step.

Culture medium of above-mentioned exchange step may be culture medium which is similar to culture medium which is used for amplification step, in addition, to be the solution like solution and for example physiological saline which do not obstruct the conversion action which cell mass of this invention has is possible. In addition, aforementioned 2) with method, after multiplying, adding para cresol, continuing culture is included the cell mass.

[0018] After conversion reaction ending, p-hydroxybenzoic acid which is formed in same way as these separation and purification of general organic compound, to do by as needed combining widely known means in solvent extraction, column chromatography, neutralization, concentration and the crystallization or other person skilled in the art it is possible method which separation and purification is done, from the fermentation broth. After excluding solid from for example fermentation broth due to centrifugal separation, to concentrate supernatant, acidification doing next and precipitating the p-hydroxybenzoic acid solid-liquid separation method of doing. Or acidification after doing above-mentioned supernatant, there is a method which separates product with solvent extraction due to ethyl acetate and the chloroform or other organic solvent. In addition, when p-hydroxybenzoic acid formation postdeposition it has done, the recovery with ethyl acetate or other solvent extraction is effective method. crude product which is acquired can be refined with various column chromatography or recrystallization or other method.

[0019] P-hydroxybenzoic acid which is produced by method of this invention is useful as the antiseptic besides it is used, as drug, pesticide, dye and the liquid crystal or other starting material.

[0020]

[Working Example(s)] This invention furthermore is explained concretely below, with Working Example.

[0021] (Working Example 1) This working example illustrates conversion from para cresol due to method of this invention with microorganism to p-hydroxybenzoic acid. culture medium which you use

was something of below-mentioned composition.

培地組成

リン酸2ナトリウム	3. 0 g
リン酸1カリウム	2. 0 g
尿素	2. 0 g
硫酸マグネシウム・7水塩	0. 2 g
炭酸ナトリウム	0. 1 g
塩化カルシウム・2水塩	0. 01 g
硫酸鉄・7水塩	0. 005 g
グリセリン	2. 0 g
酵母エキス	1. 0 g
イオン交換水	1. 0 L

PH 6. 8

(PH調整後、120℃、1. 2 Kg/cm²、20分間滅菌して使用)

【0022】上記培地100mLにエンテロバクター・クロッカエ IFO 13535の菌株1白金耳を接種し、30℃で1夜振盪培養した。得られた培養液の10mLを、同様の培地100mLを仕込んだ300mL容フラスコに接種して1日間振盪培養を行った。培養条件は、温度30℃、PH6. 8、180rpmであった。培養開始1日後および2日後にパラクレゾールを各々0. 1gづつ添加して合計3日間の培養を行った。培養終了後、遠心分離によって菌体を除き、減圧下で20mLに濃縮し、20mLの酢酸エチルで3回抽出を行った。酢酸エチル層を合わせて蒸発乾固し、エタノール：キシレンの1：1混合溶媒により再結晶させて、0. 18g(70. 4%)の精製物を得た。得られた物質は、元素分析およびNMR測定によって、パラヒドロキシ安息香酸と確認された。

元素分析値 (C7, H6, O3)

計算値：C 60. 87%、H 4. 38%

実測値：C 60. 86%、H 4. 37%

¹³C-NMR (δ ppm, DMSO-d₆ 中のTMS)

カルボニルC：169. 1

フェニレンC：115. 4、121. 3、132. 1、161. 8

【0023】(実施例2) 実施例1で使用したものと同一組成の培地に対して0. 2重量%のパラクレゾールを添加した培地100mLに、実施例1と同様にエンテロバクター・クロッカエ IFO 13535の菌株を1白金耳接種して培養した前培養液10mLを、同様にパラクレゾール0. 2重量%を添加

(After pH adjustment, 120℃, 1.2 kg/cm² and 20 min in sterilization doing use)

[0022] Inoculation it did strain 1 platinum loop of *Enterobacter cloacae* IFO 13535 in above-mentioned culture medium 100 ml, the 1 night shaking culture did with 30℃. inoculation doing 10 ml of fermentation broth which is acquired, in the 300-ml capacity flask which inserted similar culture medium 100 ml, it did 1 day shaking culture. culture conditions, was temperature 30℃, pH 6.8 and 180 rpm. At a time each 0.1 g adding para cresol after start of culture 1 day, and after 2 day it cultured total 3-day period. After culture ending, under vacuum it concentrated in 20 ml excluding cell mass due to centrifugal separation, did 3 time extraction with the ethyl acetate of 20 ml. evaporating and drying to solid it did ethyl acetate layer together, recrystallization doing with 1:1 mixed solvent of the ethanol : xylene, it acquired purified material of 0.18g(70.4%). substance which is acquired p-hydroxybenzoic acid was verified by the elemental analysis and nmr measurement.

Elemental analysis values (C7,H6, O3)

Calculated value : C 60.87 % and H 4.38 %

Actual measured value : C 60.86 % and H 4.37 %

¹³C-nmr (TMS in δ ppm and DMSO-d₆)

Carbonyl C: 169.1

Phenylene C: 115.4, 121.3 and 132. 1, 161.8

[0023] (Working Example 2) In culture medium 100 ml which adds para cresol of 0.2 wt% vis-a-vis culture medium of the same composition as those which are used with Working Example 1, 1 platinum loop inoculation doing the strain of *Enterobacter cloacae*

した培地 100 mL を仕込んだ 300 mL 容フラスコに接種して 2 日間、実施例 1 と同じ培養条件で培養を行った。2 日後の培養液中のパラヒドロキシ安息香酸の生成量は 0.20 g (78.3%) であった。培養液からのパラヒドロキシ安息香酸の分離・精製は遠心分離によって菌体を除き、上清に硫酸を加え pH を 1 とした後、この酸性溶液よりクロロホルムでパラヒドロキシ安息香酸を抽出分離し、抽出液を減圧濃縮することによって粗結晶を得た。この粗結晶を実施例 1 と同様にエタノール：キシレンの 1：1 混合溶媒により再結晶することによって白色針状結晶 0.17 g (66.5%) を得た。

【0024】(実施例 3) 実施例 1 で使用したのと同じ組成の培地 100 mL を仕込んだ 300 mL 容三角フラスコ 3 本を使用し、エンテロバクター・クロッカエ IFO 13535 を各々のフラスコに 1 白金耳接種し、30°C、180 rpm で振盪培養した。得られた培養液 300 mL を、母菌として実施例 1 と同様な培地 3.5 L を仕込んだ 5 L 容のジャー・ファーマンターに接種し、同時に基質としてパラクレゾール 6 g を添加して培養を行った。1 日後さらにパラクレゾール 5 g を添加して培養を継続し、合計 3 日間の培養を行った。培養条件は、温度 30°C、pH 7.0、攪拌 300 rpm、通気量 0.5 容量/容量/分であった。培養終了後、10,000 × G で 20 分間の遠心分離によって菌体を除き、硫酸により pH 1 とした後、実施例 2 と同様に処理してパラヒドロキシ安息香酸 1.0 g (78.3%) を得た。

【0025】(実施例 4) 実施例 1 で使用したのと同じ組成の培地に対して 0.2 重量%のパラクレゾールを添加した培地 3.5 L で 5 L 容のジャー・ファーマンターを用いて、実施例 3 と同様の培養条件で 2 日間エンテロバクター・クロッカエ IFO 13535 を培養した。2 日後に菌体を、8,000 × G で、20 分間遠心分離することによって集菌した。菌体収量は、105°C、2 時間乾燥で 4.0 g/L であった。集菌した生菌体全量を 0.2% の生理食塩水 500 mL に懸濁し、これにパラクレゾール 1.5 g を添加して 30°C で弱く攪拌しながら 2 時間反応させた。反応終了後、実施例 3 と同様の方法によりパラヒドロキシ安息香酸を抽出し、精製して再結晶によりパラヒドロキシ安息香酸 1.5 g を得た。収率は 78.3% であった。

IFO 13535 in same way as Working Example 1, inoculation doing the preculture broth 10 ml which it cultured, in 300-ml capacity flask which inserted culture medium 100 ml which adds para cresol 0.2 wt% in same way it cultured with same culture conditions as 2 day and Working Example 1. produced amount of p-hydroxybenzoic acid of culture medium after 2 day was 0.20g(78.3%). In supernatant after designating pH as 1 including the sulfuric acid, from this acidic solution p-hydroxybenzoic acid extractive separation it did separation and purification of the p-hydroxybenzoic acid from fermentation broth with chloroform excluding cell mass due to the centrifugal separation, it acquired crude crystal by vacuum concentration doing extracted liquid. This crude crystal in same way as Working Example 1 white needle crystal 0.17g(66.5%) was acquired doing with 1:1 mixed solvent of ethanol : xylene by recrystallization.

[0024] (Working Example 3) As those which are used with Working Example 1 you used 300-ml capacity erlenmeyer flask 3 which inserted culture medium 100 ml of same composition, 1 platinum loop inoculation did Enterobacter cloacae IFO 13535 in each flask, shaking culture did with 30°C and 180 rpm. inoculation it did in jar * fermentor of 5 liter capacity which inserted culture medium 3.5L which is similar to Working Example 1 with fermentation broth 300 ml which is acquired, as mother microbe simultaneously it added para cresol 6g as the substrate and cultured. After 1 day furthermore adding para cresol 5g, it continued culture, cultured total 3-day period. culture conditions, temperature 30°C, pH 7.0 and churning 300 rpm, was amount of aeration 0.5 volume / volume per minute. After culture ending, with centrifugal separation of 20 min after making the pH 1 excluding cell mass, with sulfuric acid, treating in same way as the Working Example 2 with 10,000 X G, it acquired p-hydroxybenzoic acid 1.0g(78.3%).

[0025] (Working Example 4) With culture medium 3.5 L which adds para cresol of 0.2 wt% vis-a-vis culture medium of same composition as those which are used with Working Example 1 2 day Enterobacter cloacae IFO 13535 was cultured with culture conditions which is similar to Working Example 3 making use of the jar * fermentor of 5 liter capacity. cell mass, with 8,000 X G, microbe collection was done after 2 day by the 20 min centrifugal separation doing. cell mass yield, was 4.0 g/l with 105°C and 2 hours drying. While suspension doing live cells total amount which microbe collection is done in the physiological saline 500 ml of 0.2%, adding para cresol 1.5g to this and agitating weakly with the 30°C 2 hours it reacted. It extracted p-hydroxybenzoic acid after reaction termination, with method which is similar to Working Example 3, refined and it acquired p-hydroxybenzoic acid 1.5g with the recrystallization. yield was 78.3%.

【0026】

【発明の効果】本発明の方法により、従来は高温・高圧の反応で化学合成されていた防腐剤、医薬品、農薬、染料、液晶などの原料として有用なパラヒドロキシ安息香酸をエネルギーをほとんど要せずに微生物酸化によってパラクレゾールから安価に製造することができる。

[0026]

[Effects of the Invention] With method of this invention, useful p-hydroxybenzoic acid for most part without requiring energy, from para cresol can be produced in inexpensive with the microorganism oxidation until recently as antiseptic, drug, pesticide, dye and liquid crystal or other starting material which chemical synthesis are done with reaction of high temperature * high pressure.